

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



18 MAR 2005



(43) 国際公開日
2004年4月1日 (01.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/026341 A1

- (51) 国際特許分類⁷: A61K 45/00, 45/06, A61P 35/00, 43/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/011895
- (22) 国際出願日: 2003年9月18日 (18.09.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
 特願2002-273738 2002年9月19日 (19.09.2002) JP
 特願2002-281780 2002年9月26日 (26.09.2002) JP
 特願2002-354515 2002年12月6日 (06.12.2002) JP
 特願2003-161238 2003年6月5日 (05.06.2003) JP
 特願2003-169153 2003年6月13日 (13.06.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社
オリエンタキャンサーセラピー (ORIENT CANCER
THERAPY CO.,LTD.) [JP/JP]; 〒181-0015 東京都三鷹
市大沢1丁目1番21号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 八木田 旭邦
(YAGITA, Akikuni) [JP/JP]; 〒181-0015 東京都三鷹市
大沢1丁目1番21号 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 庄司 隆 (SHOJI, Takashi); 〒101-0032 東京都
千代田区岩本町3丁目2番10号 SN岩本町ビル
6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
 — 国際調査報告書
 — 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受
領の際には再公開される。
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: IMMUNOTHERAPEUTIC FOR CANCER

(54) 発明の名称: ガンの免疫治療剤

(57) Abstract: It is intended to achieve an improved effect of a molecular target therapeutic by providing a means of elevating the complete remission rate, shortening the time required for the complete remission and achieving a synergistic effect with an immunotherapy. Namely, it is intended to establish a synergistic effect by the combined use of a novel immunotherapy focusing on CTL activity, NKT activity, NK activity, VEGF activity, etc. with a molecular target therapeutic, in particular, a tyrosine kinase inhibitor. It is found out that the combined use of a tyrosine kinase inhibitor with an IL-12 production inducer exerts a predominate synergistic effect in treating cancer.

(57) 要約: 分子標的治療薬のより有効な効果をもたらすことを目的とし、完全寛解率を上げ、完全寛解への期間の短縮化を達成し、免疫療法との相乗効果を達成するための手段を提供するものである。つまり、CTL活性、NKT活性、NK活性及び-VEGF等に着目する新免疫療法と分子標的治療薬特にチロシンキナーゼ阻害剤の併用による相乗効果の達成を課題とする。チロシンキナーゼ阻害剤とIL-12産生誘導剤の併用がガン治療における優位な相乗効果を達成することを見出し本発明を完成した。

明細書

ガンの免疫治療剤

- 5 本出願は、参照によりここに援用されるところの、日本特許出願番号 2002-273738, 2002-281780, 2002-354515, 2003-161238, 2003-169153 からの優先権を請求する。

技術分野

- 10 本発明は、癌治療の新たな領域を提供するものである。すなわち、新規な癌治療法として着目されるチロシンキナーゼ阻害剤と医学博士八木田旭邦が開発した NK 細胞の活性化能、NKT 細胞の活性化能、血管新生阻害能、IL-12 の産生誘導能及び IFN γ の産生誘導能の動態に着目した新免疫療法の併用による新規なガン治療剤の提供に関する。

15

背景技術

- ガン (malignant neoplasms) (cancer) の予防または治療のために有用な物質の選別には、従来、ガン細胞へのその直接的作用が重要視されていた。免疫賦活剤がガン治療に有用であることは認められていたが、免疫賦活剤として得られた
20 化合物はいずれもその抗ガン効果が微弱であり、免疫療法単独または化学療法との併用治療によってもガンの十分な治療効果は達成されていない。

- 本発明者の医学博士、八木田は、先にガン治療における画期的な手法として、インターロイキン 12 (IL-12) を生体内で誘発する物質の有用性に着目し、キノコ菌糸体加工物がその機能を有することを発見し、新免疫療法 (Novel Immuno
25 therapy for cancer) (NITC) ともいうべきガン治療法を確立した。従来 IL-12 は、抗ガン効果があるものの生体内に IL-12 自体を直接投与した場合には副作用を生じるために患者が治療に耐えられないという事実があり、それ自体を抗ガン

剤として使用できなかった。しかし、八木田が報告したキノコ菌糸体加工物を含む製剤は、ガンの治療において著しい治癒・延命効果を達成した。つまり八木田は、IL-12 を生体内で誘発できる有効量のキノコ菌糸体加工物を投与することにより、ガンの治療目的を達成した {(特許文献1) 特開平10-139670号公報}。

IL-12 は、 $\text{TNF}\alpha \rightarrow \text{IFN}\gamma \rightarrow \text{IL-12} \rightarrow \text{CTL}$ 活性というルートでキラーT細胞の活性化効果と増強効果をもつ。つまり IL-12 の産生増強は、キラーT細胞の活性化と増強により抗ガン効果が期待される。

八木田は、IL-12 の産生増強の系とは別に NKT 細胞の活性化が抗ガン効果に有用であることを報告している。谷口等は、NKT 細胞が有する $V\alpha 24 V\beta 11$ という特異的なT細胞抗原受容体 (TCR) が認識する特異的な糖脂質抗原を発見し、この抗原が、 α ガラクトシルセラミドであることを報告している。更に、 α ガラクトシルセラミドを投与した担ガンマウスでは、NKT 細胞が活性化され、ガンの消失はみられないものの転移が抑制されることを証明した。

NKT 細胞には、もう一つの受容体として NK 細胞抗原受容体 (NKR-P1; ナチュラルキラー受容体 P1) があることは報告されている {(非特許文献1) 特集 NKT 細胞の基礎と臨床:最新医学 55 巻 4 号 2000 年 818~823 ページ}。

NKR-P1 も NKT 細胞の活性化に関与し、この活性化が抗ガン効果がより優位であることを八木田は見出している {(特許文献2) US2002-0010149A1}。

ガンの分子標的治療剤が新タイプの制癌剤として従来の細胞標的治療剤と対比してその意義が着目されている。そのなかでも特にシグナル伝達阻害作用を有する薬剤としてチロシンキナーゼ阻害剤は注目されている。ZD1839 (イレッサ:登録商標 アストラゼネカ) は EGFR (上皮成長因子受容体) チロシンキナーゼの ATP 結合部位における ATP との競合作用を有し、チロシンキナーゼの自己リン酸化を抑制することでチロシンキナーゼ活性を抑制する。その結果、EGFR のもつ増殖、浸潤、分化、転移に関連するシグナル伝達 [EGFR の細胞外ドメインに上皮成長因子 (EGF) 等のリガンドが結合することにより、細胞内ドメインに

ある EGFR チロシンキナーゼが活性化し、EGFR の自己リン酸化および種々の細胞内標的たんぱく質のリン酸化を引き起こすことにより細胞表面から核への増殖シグナルが伝達され、癌細胞表面から核への増殖シグナルが伝達され、癌細胞の増殖、浸潤、転移、血管新生を起こす] を遮断することにより抗癌作用を発現する。

- 5 IMC-C225 (EGFR 標的モノクローナル抗体) は細胞膜表面の EGFR レセプター部分を認識し、EGFR の自己リン酸化を抑制することでチロシンキナーゼ活性を阻害する。ハーセプチンは EGFR と相同性をもつ Her2/Neu に対するモノクローナル抗体であり、STI-571 (グリベック) は BCR-Abl のチロシンキナーゼ活性の阻害と c-kit のチロシンキナーゼ活性の阻害能を有する{(非特許文献 2) 血液・免疫・腫瘍 Vol. 7 No.3 2002-7}。

- 15 このような分子標的治療剤は新メカニズムのガン治療薬として着目されるが、その効果はいまだ革命的とはいえない。たとえば、ZD1839 (イレッサ) はアストラゼネカ社が新規に開発した強力かつ選択的な EGFR チロシンキナーゼ阻害剤であり、ヒトでもその有用性が判明している。しかし非小細胞肺癌や前立腺癌などでの臨床成績は PR (部分寛解) が 10~20 数%で、CR (完全寛解) は全くないと言ってもよいが、あっても極くまれで完全寛解まで 4 ヶ月以上の期間がかかっていた。そこで ZD1839 (イレッサ) と各種抗癌剤との併用療法が試みられているものの現時点では相加あるいは相乗効果は得られていない。

20 発明の開示

本発明は、上記のような分子標的治療薬のより有効な効果をもたらすことを目的とし、完全寛解率を上げ、完全寛解への期間の短縮化を達成し、免疫療法との相乗効果を達成するための手段を提供するものである。つまり、CTL 活性、NKT 活性、NK 活性及び VEGF 等に注目する新免疫療法と分子標的治療薬特にチロシンキナーゼ阻害剤の併用による相乗効果の達成を課題とする。

25

本発明は、チロシンキナーゼ阻害剤と IL-12 産生誘導剤の併用がガン治療における優位な相乗効果を達成することを見出し本発明を完成した。

すなわち本発明は、

「1. チロシンキナーゼ阻害剤と IL-12 産生誘導剤が併用されることを特徴とするガンの治療剤。

5 2. チロシンキナーゼ阻害剤が、以下の 1) ~ 7) の少なくとも 1 の受容体に対する選択的標的作用を有する前項 1 のガンの治療剤。

1) HER2/neu、2) HER3、3) HER4、4) c-kit、5) PDGFR、6) bcr-abl、
7) EGFR

10 3. チロシンキナーゼ阻害剤が、選択的 EGFR 又は c-kit 標的作用を有する前項 1 のガンの治療剤。

4. IL-12 産生誘導剤が、 β 1,3/1,6 グルカン構造を有する物質である前項 1 ~ 3 の何れかーに記載のガンの治療剤。

5. IL-12 産生誘導剤が、 β 1,3/1,6 グルカン構造を有する茸菌糸体由来成分又は酵母由来成分である前項 4 のガンの治療剤。

15 6. ガンの化学療法剤及び放射線治療との併用無しに処置される前項 1 ~ 5 の何れかーに記載のガンの治療剤。

7. NKT 細胞の NKR-P1 に選択的に作用して NKT 細胞を活性化をおこす物質と併用される前項 1 ~ 6 の何れかーに記載のガンの治療剤。

20 8. 血管新生阻害能を有する物質と併用される前項 1 ~ 7 の何れかーに記載のガンの治療剤。

9. 以下の 1) 又は 2) のいずれか 1 をマーカーとしてチロシンキナーゼ阻害剤と IL-12 産生誘導剤の併用治療が行われる前項 1 ~ 8 の何れかーに記載のガンの治療剤。

1) NKTP 値の投与前値が 5.0%以上の測定値を示す、

25 2) Th2 値の投与前値が 3 %以上の測定値を示す

10. Th1/Th2 比がイレッサ投与前値に比較して投与数ヶ月後に増加の測定値を示すことを併用治療の継続のマーカーにする前項 1 ~ 9 の何れかーに記載のガン

の治療剤。

1 1. NKTP 値の投与前値が、5.0%未満の測定値を示すことを特徴とする前項 10 に記載のガンの治療剤。

1 2. IL-12、INF γ の測定値が、イレッサ投与前値に比較して投与数ヶ月後の値
5 で低下していないことを併用治療の継続のマーカーにする前項 9 に記載のガンの治療剤。

1 3. ガンの治療剤が肺（腺）ガン治療剤であることを特徴とする前項 1～12 の何れかーに記載のガンの治療剤。

1 4. 前項 1～13 の何れかーに記載のガン治療剤を用いたガンの治療方法。」
10 からなる。

図面の簡単な説明

（図 1）患者のレントゲン図

（図 2）患者のレントゲン図

15 （図 3）破骨細胞分化の必須シグナルの図

（図 4）肺（腺）癌の奏効例

（図 5）大腸癌の奏効例

（図 6）各種癌での奏効例

（図 7）ロジスティック回帰係数分析による各マーカーの奏効に対する寄与度（肺
20 腺ガン）

（図 8）イレッサ投与患者におけるロジスティック回帰係数分析による各マーカーの奏効に対する寄与度（肺腺ガン）

（図 9）イレッサ投与前における有効例（B 群）と無効例（A 群）の比較

（図 10）NKTP<5.0 における有効例（B 群）と無効例（A 群）の比較

25 （図 11）2つの閾値による有効・無効群

（図 12）イレッサと新免疫療法との作用時期の相違

（図 13）イレッサ投与前における C 群及び D 群の比較

(図 1 4) C 群、D 群におけるサイトカインの相違

(図 1 5) イレッサと NITC との抗腫瘍作用における相乗作用機序仮説

発明を実施するための最良の形態

5 以下、本発明を詳しく説明するが、本明細書中で使用されている技術的および科学的用語は、別途定義されていない限り、本発明の属する技術分野において通常の知識を有する者により普通に理解される意味を持つ。

本発明者の医学博士八木田のガン新免疫療法 (NITC) とは 4 つの異なる作用機序を組み合わせることからなる治療手段である。

10 第一の作用機序は、血管新生阻害物質 (ベターシャーケ) を投与してガンへの血流を障害してガン縮小をはかる方法である。これは血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を測定することでその効果は判定が可能である。血管新生阻害作用は VEGF 値のマイナス (負) 値 (-VEGF) で評価できる。この VEGF 値の替わりに FGF、HGF などのその他の血管増殖因子を用いることも血管新生阻害能を評価することが可能である。また VEGF の代わりに血管新生阻害因子の正数値でもその評価が可能である (例えばエンドスタチン値)。

第 2 の作用機序は、 β 1,3 グルカン構造を担持する化合物を投与して Th1 サイトカイン (TNF α 、IFN γ 、IL-12) を誘導して CTL を活性化する方法である。CTL 活性は CD8(+) パーフォリン産生能力で判定が可能であるが、この CD8(+) パー
20 フォリン値には細胞障害性 T 細胞 (CTL) と免疫抑制性 T 細胞 (STC; Suppressor T cell) とがあり、前者はガン細胞を障害し、後者の活性化は結果的にガンの増殖につながる。したがってその絶対値では評価はできない。しかし前者は IFN γ が 10 IU/ml 以上かもしくは IL-12 値が 7.8 pg/ml 以上であれば CTL であり、IFN γ と IL-12 が低値であれば STC と判定される。そこで CTL 活性は、IFN γ 産生能力
25 (IFN γ 値) もしくは IL-12 産生能力 (IL-12 値) で評価が可能である。

第三及び第四の作用機序である α 1,3 グルカン構造を担持する化合物の投与によって活性化される effector 細胞は NK 細胞と NKT 細胞である。この NK と NKT

細胞とは NKR-P1(NK 細胞受容体 CD161(+))を共有しており、前者は CD3(-)CD161(+)の表面マーカーで NK 細胞数は測定可能であり、その活性化は CD3(-)CD161(+)パーフォリン産生能力で判定が可能である。一方後者の NKT 細胞は CD3(+)CD161(+)でその細胞数は測定が可能となり、そのパーフォリン産生能力 (NKTP と記す) で NKT 細胞の活性化は測定可能である。

したがってガン治療における新免疫療法 (NITC) であっても一般的な免疫療法であっても、以下の測定項目でそれぞれの effector 細胞もしくは血管新生阻害作用を評価することが可能である。具体的には、CTL 活性は IFN γ あるいは IL-12 の産生誘導能力で評価が可能である。NK 細胞の活性化は CD3(-)CD161(+)もしくは CD3(-)CD161(+)パーフォリン値でも評価可能である。NKT 細胞の活性化は CD3(+)CD161(+)もしくは CD3(+)CD161(+)パーフォリン値 (NKTP 値) でも評価が可能である。

本発明は、上記の新免疫療法にチロシンキナーゼ阻害剤を併用することによる臨床における結果を検討することにより行われた。本発明者は、新免疫療法 (NITC) として、ガン患者に α 1,3 グルカン構造を担持する化合物、 β 1,3 グルカン構造を担持する化合物と血管新生阻害作用物質 (サメ軟骨) を併用し、IL-12、IFN γ 他の各種サイトカインを測定した。なお、CD8 (+) パーフォリン産生は、IFN γ 及び IL-12 の産生とは強い正の相関性が存在し、この結果、CD8 (+) パーフォリン産生の測定は CTL 活性ルートの評価に意義を見出している。

この意義により CD8 (+) パーフォリン産生能の測定は、有用な CTL 活性化剤 (つまり IL-12 産生誘発剤) のスクリーニング方法に適用可能であり、このスクリーニング方法を利用すれば CTL 活性化能 (IL-12 産生誘発能) を担持する新規 β 1,3 グルカンの特定が可能である。本発明で使用する、IL-12 産生誘導剤は特に限定せず、広く使用可能である。例えば、 β 1,3 グルカン構造を持つ茸菌系体組成物製剤 (例えば ILX 商品名 : 東西医薬研究所、ILY 商品名 : セイシン企業、AHCC : アミノアップ)、或は β 1,3 グルカン構造を持つ各種酵母 (海洋性酵母、パン酵母、NBGTM) が利用できる。また、新規な IL-12 産生誘導剤は、CD8 パ

ーフォリン産生能の測定を組み合わせることで当業者は容易に IL-12 産生誘導剤 (CTL 活性化剤) を特定可能である。CTL 活性化剤は、本発明で使用する IL-12 産生誘導剤と同義である。

本発明では、この IL-12 産生誘導剤とチロシンキナーゼ阻害剤の併用が必須である。具体例では、ZD1839 (イレッサ商品名) 又は STI571 (グリベック商品名) を使ったが、各種チロシンキナーゼ阻害剤が有効に利用できる。それらは標的分子として、HER2/neu、HER3、HER4、c-kit、PDGFR、bcr-abl、EGFR 等が例示される。最も効果的な分子は EGFR 又は c-kit である。

チロシンキナーゼ阻害剤の投与量は、各分子標的化合物の推奨投与量に従うが、10~500mg/日の経口投与がおこなわれる。

IL-12 産生誘導剤とチロシンキナーゼ阻害剤の併用は、特に限定はされないが、治療初期からでもどちらを先行させていても良い。具体例では、NITC 療法特に IL-12 産生誘導剤を一定期間投与後に、チロシンキナーゼ阻害剤を併用し、劇的な臨床効果を確認した。

本発明では、IL-12 産生誘導剤に加えて、NK 活性化剤又は NKT 活性化剤の併用が可能である。ニゲロオリゴ糖、フコイダン等の α 1,3 グルカン構造を持つ化合物の組成物製剤が NK 活性化剤又は NKT 活性化剤として有用である。 α 1,3 グルカン構造を持つ化合物は種々知られており、この既知構造と CD3(-)CD161(+), CD3(-)CD161(+) パーフォリン産生能、CD3(+)CD161(+), CD3(+)CD161(+) パーフォリン産生能の測定を組み合わせれば当業者は容易に NK 活性化剤又は NKT 活性化剤を特定可能である。なお、CD3(+)CD161(+) は NKT 細胞の受容体 NKR-P1 に作用することを意味する。

α 1,3 グルカン構造の糖類物質としては、例えば、ニゲロオリゴ糖 (TSO)、フコイダン、硫酸オリゴ糖等が挙げられる。

ニゲロオリゴ糖は、3-O- α -D-グルコピラノシル-D-グルコースを構成単位として含有する糖類である。代表的なものとしては、ニゲロース、ニゲロシルグルコース、ニゲロシルマルトース等が挙げられる。

また、市販されているニゲロオリゴ糖としては、ニゲロオリゴ糖液糖（販売者・武田食品工業株式会社）が挙げられるが、これが含有する主なニゲロオリゴ糖は

(1) ニゲロース α -D-Glc p-(1,3)-D-Glc (2) ニゲロシルグルコース α -D-Glc p-(1,3)- α -D-Glc p-(1,4)-D-Glc (3) ニゲロシルマルトース α -D-Glc p-(1,3)- α -D-Glc p-(1,4)- α -D-Glc p-(1,4)-D-Glc (なお、Glc はグルコース、p はピラノースの略号である) である。

フコイダンは、狭義ではフコースの2乃至6分子に硫酸1分子が結合した硫酸化フコース含有多糖類であり、これにキシロースあるいはウロン酸を含有したフコイダン様多糖体を食品レベルで「フコイダン」と称している。フコイダンは、例えばコンブを破碎し、チップ化し、水溶液成分を抽出した後、抽出残渣を遠心分離により除去し、ヨードや塩化ナトリウム等の低分子物質を限外ろ過により除去して凍結乾燥化して製剤化される。

フコイダンとしては、褐藻類由来フコイダン、例えばガゴメコンブ由来のフコイダン、およびオキナワモズク由来フコイダン等が例示される。ガゴメコンブ等の褐藻類コンブ科由来のフコイダンには少なくとも3種類のフコイダン、F-フコイダン (α -L-フコースのポリマー)、U-フコイダン (β -D-グルクロン酸と α -D-マンノースを主鎖とし、側鎖に α -L-フコースをもつ)、G-フコイダン (β -D-ガラクトースを主鎖とし、側鎖に α -L-フコースをもつ)、が存在しており、いずれのフコイダンもフコースが硫酸化されている。

硫酸オリゴ糖としては、例えば株式会社白子製のスサビノリ (*Poryphyra Yezaensis*) 由来の抽出物があげられる。該抽出物の主成分は α 1,3 結合のガラクトタン硫酸のオリゴ糖と α 1,3 結合および β 1,4 結合よりなるガラクトタン硫酸のオリゴ糖である。

本発明のチロシンキナーゼ阻害剤と CTL 活性化剤 (IL-12 産生誘導剤、INF γ 産生誘導剤) との併用、更には NK 活性化剤、NKT 活性化剤、新生血管阻害剤との併用は、その適用法を選別することで肺ガン (肺扁平上皮ガン、肺腺ガン、小細胞肺ガン)、胸腺腫、甲状腺ガン、前立腺ガン、腎ガン、膀胱ガン、結腸ガン、

直腸ガン、食道ガン、盲腸ガン、尿管ガン、乳ガン、子宮頸ガン、脳ガン、舌ガン、咽頭ガン、鼻腔ガン、喉頭ガン、胃ガン、肝ガン、胆管ガン、精巣ガン、卵巣ガン、子宮体ガン、転移性骨ガン、悪性黒色腫、骨肉腫、悪性リンパ腫、形質細胞腫、脂肪肉腫等の治療に有効である。

- 5 本発明に係るチロシンキナーゼ阻害剤と CTL 活性化剤 (IL-12 産生誘導剤、 $\text{INF}\gamma$ 産生誘導剤) の併用、更には NK 活性化剤、NKT 活性化剤、新生血管阻害剤との併用は、その活性化を誘導または増強し、さらに活性化を維持できる処方に用いられる。すなわち、その活性化を誘導または増強し、さらに活性化を維持できる投与量、ならびに投与期間を選択して用いられる。具体的には、その投与
- 10 量は、NK 活性化剤又は NKT 活性化剤である α -1,3 グルカン構造を持つ化合物は 1 g ~ 40 g / 日程度、好ましくは 5 g ~ 20 g / 日程度で、CTL 活性化剤 (IL-12 産生誘導剤、 $\text{INF}\gamma$ 産生誘導剤) である β -1,3 グルカン構造を持つ化合物は 1 g ~ 10 g / 日程度、好ましくは 3 g ~ 6 g / 日程度である。また、投与期間は一般的には 10 日間 ~ 24 ヶ月間、投与頻度は隔日又は 1 ~ 3 回 / 日で、
- 15 好ましくは連日投与である。当該 CTL 活性化剤 (IL-12 産生誘導剤、 $\text{INF}\gamma$ 産生誘導剤)、NK 活性化剤、NKT 活性化剤は、好適には経口摂取される。無論、投与量を減少させ、これらを非経口に耐え得る品質に調製することで、非経口摂取 (静脈内または筋肉内投与などを含む) も可能である。

- 抗ガン (化学療法) 剤、放射線、あるいはステロイド併用療法を、本発明の併
- 20 用に加えて行う場合には、2 種類の免疫系のうち、 $\text{TNF}\alpha \rightarrow \text{IFN}\gamma \rightarrow \text{IL-12} \rightarrow$ キラー T 細胞の系統が著しく障害される。そのためこれらは本発明では用いないことが好ましい。但し抗ガン剤を投与するとき、上記の免疫系を障害しない投与方法である低濃度化学療法すなわち 5 FU、UFT、ミフロール、フルツロン、CDDP (5 μ g ~ 10 μ g) の低濃度やタキソテールあるいはタキソール、アドリアマイ
- 25 シン、マイトマイシン、CPT-11 などの低濃度抗ガン剤の投与法等を適用することは有用である。また同様に放射線療法において低容量照射の適用、ステロイド療法においても低濃度投与等を選択する必要がある。

細胞および各サイトカインの測定方法を以下に例示する。

(NKT 細胞の測定) (NK 細胞の測定) (CD8 の測定)

5 NKR-P1 を有する NKT 細胞の測定は、NKT 細胞の細胞表面に特異的に存在する細胞表面抗原 (CD3 および CD161) の測定により行うことができる。具体的には、末梢血中のリンパ球について、CD3 が陽性でかつ CD161 が陽性 (CD3+CD161+) の細胞を検定する。つまり、NKT 細胞の細胞表面抗原である CD3 および CD161 を、モノクローナル抗体を用いてフローサイトメトリーを使用する Two Color 検査により測定する。ここで NKT 細胞が活性化されているとは、リンパ球の中で CD3+CD161+NKT 細胞の割合が 10% 以上、より好ましくは 16% 以上であることをいう。NKT 細胞活性化能とは、NKT 細胞の割合を 10% 以上、より好ましくは 16% 以上に増加せしめる機能、またはある物質を投与する前の NKT 細胞の割合より更に増強せしめる機能を意味する。

15 同様に (CD3-CD161+) とは CD3 が陰性でかつ CD161 が陽性の細胞を検定することである。この方法は NK 細胞の測定に有用である。

さらに CD8+ とは CD8 が陽性の細胞を検定することである。この方法は CTL 活性の測定に有用である。

20 実施例ではガン患者の血液を用いて、血中細胞について細胞表面抗原である CD3、CD161、CD8 について陽性・陰性で区別し、各細胞の割合を、フローサイトメトリーを用いた Two Color 検査により常法通り測定した。このとき CD3、CD161、CD8 に対するモノクローナル抗体は、それぞれコールター社製製又はベクトンディッキンソン社製ものを使用した。

(パーフォリン産生細胞の測定)

25 末梢血中のリンパ球について、細胞表面抗原である CD3、CD161、CD8 のうち 2 者とパーフォリンについてフローサイトメトリーを用いた Three Color 検査により常法通り測定する。具体的には、採取した血液に固定液を加えて細胞を固定し、膜透過液を添加後抗パーフォリン抗体 (Pharmlngen 社製) を添加して反

応させ、さらにPRE-Cy 5 標識二次抗体(DAKO 社製)を添加して反応させ、
ついで抗 CD3-PE (Coulter 6604627) 抗体および抗 CD161-FITC (B-D) 抗体
を添加して反応させ、その後フローサイトメトリーで測定する。図・表中での略
語は PER と表示した。

5 (サイトカインを測定するための試料の調製)

まず、血液より単核球画分を分離調製する。ヘパリン加末梢血をリン酸緩衝生
理食塩水 (Phosphate Buffered Saline) (PBS) で 2 倍に希釈して混和した後、
Ficoll-Conray 液 (比重 1.077) 上に重層し、400 G で 20 分間遠沈後、
単核球画分を採取する。洗浄後、10%牛胎児血清 (FBS) を加えた RPMI
10 -1640 培地を加え、細胞数を 1×10^6 個となるように調製する。得られた
細胞浮遊液 $200 \mu\text{l}$ にフィトヘマグルチニン (Phytohemagglutinin) (DIFCO
社製) を $20 \mu\text{g/ml}$ の濃度となるように加え、96 穴マイクロプレートにて
5% CO_2 存在下、 37°C で 24 時間培養し、該培養した細胞溶液中のサイトカ
インを測定する試料とする。

15 (IL-12 の測定)

IL-12 量の測定は自体公知の臨床、生化学的検査を利用できるが、R&D
SYSTEMS 社や MBL 社より入手することのできる酵素免疫測定法 (ELISA) に
よる測定キットが使用される。ここでは R&D SYSTEMS 社の測定キットを用い
た。実際には 96 穴マイクロプレートの各穴に測定用希釈液 Assay Diluent
20 RD1F を $50 \mu\text{l}$ 、標準液 (standard) または前記サイトカイン測定用試料の調
製法で調製した試料を $200 \mu\text{l}$ ずつ分注した後、室温にて静置して 2 時間反応
させた。その後、西洋わさびパーオキシダーゼ (horse radish peroxidase) (H
R P) 標識抗 IL-12 抗体を $200 \mu\text{l}$ ずつ分注し 2 時間室温で静置した。各穴の
反応液を除去し 3 回洗浄後、発色基質溶液を $200 \mu\text{l}$ ずつ分注し、20 分間室
25 温静置後、酵素反応停止溶液を $50 \mu\text{l}$ ずつ分注した。 550 nm を対照として
 450 nm における各穴の吸光度を Emax (和光純薬株式会社製) にて測定し
た。IL-12 量は、 pg/ml として表される。ここで IL-12 産生誘発能とは、末

梢血単核球画分が刺激により産生する IL-12 量を、 7.8 pg/ml 以上に増強せしめる機能、またはある物質を投与する前の IL-12 産生量より増強せしめる機能を意味する。

(IFN γ の測定)

- 5 IFN γ の測定は、BioSource Europe S.社の IFN γ E A S I A キットを用いて、酵素免疫測定法 (E I A 法) で測定した。実際には 96 穴マイクロプレートの各穴に標準液 (standard) または上記調製した試料を 2 倍希釈したものを $50 \mu\text{l}$ ずつ分注し、HRP 標識抗 IFN- γ 抗体を $50 \mu\text{l}$ ずつ分注し更に振盪しながら 2 時間室温で反応させた。各穴の反応液を除去し 3 回洗浄後、発色基質溶液を
- 10 $200 \mu\text{l}$ ずつ分注し、振盪しながら 15 分間室温で反応させ、酵素反応停止溶液を $50 \mu\text{l}$ ずつ分注した。 630 nm を対照として 450 nm および 490 nm における各穴の吸光度を E m a x (和光純薬株式会社製) にて測定した。IFN γ 量は、 IU/ml として表される。

(血管新生阻害能の測定)

- 15 (血管内皮細胞増殖因子/VEGF と塩基性繊維芽細胞増殖因子/bFGF 及び血管新生阻害因子エンドスタチン/endostatin の測定)

市販キットの各酵素免疫固相法 (ELISA: enzyme linked immuno sorbent assay) (ACCUCYTE Human VEGF, ACCUCYTE Human bFGF, ACCUCYTE Human Endostatin: CYTIMMUNE Sciences Inc.) で血清中濃度を測定した。

- 20 (Th 2 の測定)

Th 2 とは、細胞表面抗原 CD 4 を有するヘルパー T 細胞 (100%) の中で、IFN γ 陰性かつ IL-4 陽性細胞の割合値を示すものである。

- 癌患者血液をブレフェルジン A (B r e f e r d i n A : B F A) 存在下でホルボール 12-ミリステート-13-アセテート (p h o r b o l 12-M y r i s t a t e 13 A c e t a t e : P M A) 及びイオノマイシン (I o n o m y c i n) を加え、 37°C で 4 時間刺激した。PMA, イオノマイシンで
- 25 血液中の細胞を刺激してサイトカインを産出させ、BFA で細胞内タンパク質の

細胞外への輸送を阻害した。このようにして調製された活性化検体にCD4-PC5 (Beckman Coulter 社) を加えて細胞表面のCD4を染色した。次に、FACS Lysing Solution (Becton Dickinson) で溶血及び固定処理をした後、更にFACS Permeabilizing Solution (Becton Dickinson) で細胞膜透過処理を行なった。その後、IFN- γ FITC/IL-4 PE (Becton Dickinson) を用いて細胞内サイトカインを染色し、フローサイトメーター (FACS Calibur、Becton Dickinson) で測定し、解析を行った。

{Th1/Th2 (細胞) 比の測定}

10 Th1/Th2細胞比は、フローサイトメトリーによるヘルパーT (Th) 細胞系統Three color解析検査によって常法により検定した。Th1/Th2とは、細胞表面抗原CD4を有するヘルパーT細胞のなかでIFN γ を産生する細胞 (Th1) とIL-4を産生する細胞 (Th2) の比率を表すもので、 $CD4 \times IFN\gamma / IL-4$ と記す。

15 まず癌患者血液を、ホルボール12-ミリステート-13-アセテート (phorbol 12-Myristate 13 Acetate) とイオノマイシン (Ionomycin) により37℃で4時間処理し、血液中の細胞を刺激してサイトカインを産生させた。次いでブレフェルジンA (Breferrdin A) を加えて産生反応を停止させ、抗CD4抗体であるCD4-PC5 (Beckman Coulter 社) を用いて細胞表面マーカーであるCD4を染色し、細胞を固定後、FACS Lysing Solution (日本ベクトンディッキンソン社) を用いて溶血処理した。その後FACS Permeabilizing Solution (日本ベクトンディッキンソン社) により細胞膜透過処理を行い、更に抗IFN γ 抗体/抗IL-4抗体 (FASTIMMUNE IFN γ FITC/IL-4 PE, 日本ベクトンディッキンソン社) で細胞内のサイトカインを染色して、フローサイトメーター (FACS Calibur、Becton Dickinson 社) で測定および解析を行った。

20

25

(TNF α の測定方法)

1. 単核球の分離調製と培養

ヘパリン加末梢血をリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate Buffered Saline) (PBS) で2倍に希釈して混和した後、Conray-ficoll液 (比重1.077) 上に
5 重層し、1800rpmで20分間遠沈後、単核球画分を採取した。洗浄後、10%
牛胎児血清 (FBS) を加えたRPMI-1640培地を加え、リンパ球数を1
 $\times 10^6$ 個/mlとなるように調製した。得られた細胞浮遊液200 μ lにフィト
ヘマグルチニン (Phytohemagglutinin: 30 μ g/ml) (DIFCO 社製) を2
0 μ l加え、96穴マイクロプレートにて5%CO₂存在下、37℃で24時間
10 培養した。培養後は、測定まで凍結保存した。

2. ELISAによる測定

あらかじめ抗ヒトTNF α が固相化されている抗体プレートに標準液又は被検
検体を加えて反応させた。次に、プレートを洗浄し、POD標識抗ヒトTNF α
モノクローナル抗体 (酵素標識抗体) を加えて反応させた。再度プレートを洗浄後、
15 基質を加えて酵素反応を行い、活性を波長492nmにおける吸光度として読み取
った。

なお、臨床検査に用いた各マーカーは何れも市販品を用い、各推奨の方法によ
り測定値を示した。表示される略字は各一般的な表示方法によった。

患者の効果判定は、次のCR (完全寛解)、PR (部分寛解)、LNC (長期不変)、
20 SNC (短期不変)、PD (病状進行) の5段階判定を行った。また、各癌種での奏
効率とは、各癌種の全症例中のCR、PR、LNC、SNC、PDの割合を示す (例、
症例数7の結腸癌における、PR 71.4% とは7症例中の内5症例がPRを表す)。

実施例

25 以下に、実施例を用いて本発明を具体的に説明するが、本発明は本実施例に限
定されるものではない。

新免疫療法 (NITC) として進行末期癌症例に対し治療を行ってきた。2002年

4 月末現在 3490 例中 35.3%の CR、PR の奏効例を得ている。この NITC は β -1,3 グルカンの投与で内因性 $\text{TNF } \alpha$ 、 $\text{IFN } \gamma$ 、IL-12 を誘導して CTL (キラーT 細胞) を活性化し、かつ α -1,3 グルカンの投与で NK および NKT 細胞の活性化をはかると共にベターシャークの経口投与で血管新生阻害をはかる BRM 療法である。

- 5 患者には、IL-12 産生誘発剤、さめ軟骨 (セイシン企業)、及び α 1,3 構造をもつ糖類等を、各推奨処方により投与された。また、IL-12 産生誘導剤として、ILX (東西医薬)、ILY (セイシン企業)、クレスチン (三共)、イミュトール (NBG) 等を患者の症状により、単独又は併用して投与がなされ、略同一の結果を得た。

10 (実施例 1)

症例 1

- 今回、末期肺腺癌 (両肺粟粒性肺転移) で頸椎、胸椎および股関節の骨転移かつ脳転移も認められた症例 (NITC PD 例) にイレッサ 250mg/日の経口投与を追加したところ 1 ヶ月半で癌性胸水と原発性肺癌が完全に消失かつ右股関節・頸椎・胸椎の骨転移も治癒し、 $\text{TNF } \alpha$ 、 $\text{IFN } \gamma$ 、及び IL-12 も基準値を超えて活性化され、各種腫瘍マーカーも正常化し CR と判定された。(図-1) (表-1)
- 15

(以下余白)

(表 1)

症例① 両肺粟粒性肺転移

NS 39y.o. Male 肺腺Ca. 頸椎・胸椎・右股関節転移、脳転移

初診 2001/10/30

受付日	治療期間(月)	有効性	CD3+ CD16 1+(16%)	CD3- CD16 1+(11%)	CD8+ PER+ (14%)	TH1/ TH2 CD4) 比(7以上)	TNF α (1000 pg/ml)	IFN γ (10 IU/ml)	IL-12 (7.8p g/ml)	IL-10 (pg/ ml)	VEGF (pg/ ml)	CEA (5.0ng /ml)	CA19- 9 (37U/ ml)	SPA N-1 (30U /ml)	NCC -ST- 439 (7.0U /ml)	CA15 -3 (30U /ml)	BCA2 25 (160 U/ml)	LEX- 1 (38U /ml)	1CTP (4.5n g/ml)	IL-2 1 μ g /ml
2001/10/30	0		9.8	7.1	26.4	14.9	42	2.4	7.8>	100	1060	35.3		340		35		160	4.3	898
2001/11/28	1	NC								856	39.2			370				130	3.1	898
2001/12/26	2	NC								599	59.5			410	18			98	4.6	
2002/1/22	3	PD	8.1	6.1	13.6	14.7	1590	26.1	22.8	167	642	81.1	800		29			140	5.2	609
2002/2/20	4	PD								836	207		2400		65	11	37	170	4.7	546
2002/3/20	5	PD								1040	465		7900	1300	240			430	6.2	674
2002/4/16	6	PD	9.5	8.5	15.6	16.6	87	1.6	7.8>	123	1190	749	17000	2900	490	29	45	1300	6.2	1060
2002/5/15	7	PD								1600	864		15000	4500	620			1300	6.8	1010
2002/6/12	8	NC								602	1100		21000	2900	940	70	45	1600	9.4	659
2002/8/7	9	PR	12.5	11.2	23.8	40.7	99	0.4	7.8>	37	625	1080	9500	2000	1100	100		1900	15.9	564
2002/9/4	10	PR	13.4	13.2		47.2	2003	32.4	23.6	73	362	309	1400	390	190	40		440	13.9	626
2002/9/18	11	CR								320	4.5		32	16	6.7	26		36		

2002/7/23
イレッサ
投与開始

症例 2

前立腺癌で多発骨転移の症例でホルモン抵抗性、抗癌剤抵抗性、免疫療法抵抗性の末期癌症例に ZA1839（イレッサ）250mg/日を NITC に併用追加投与したが 1 ヶ月で多発骨転移も完全寛解し PSA の値も 170ng/ml から 4.0ng/ml と正常化した。（CR 判定）（表-2）

（以下余白）

10

15

20

25

(表 2)

症例② KH 53y.o. Male 前立腺
Ca. 多発骨転移 初診 1997/5/24

受付日	治療期間(月)	有効性	CD3+ CD16 1+(16 %)	CD3- CD16 8+P ER+ CD4(14 (11%)	CD TH1/ TH2(TNF α (1000 pg/ml)	IFN γ (10 IU/ml)	IL- 12 (7.8p g/ml)	IL-10 (pg/ml)	VEG F(pg /ml)	DU PA 9-9 (37 N-2 (150 U/m l)	CAI 9-9 (37 LEX -1 (38U U/m l)	CA 72- 4 (40 U/ ml)	STN コカ ン (45U /ml)	NS ER A (10 ng/ ml)	BF P (75 ng/ ml)	PAP P (3.0n g/ml)	PAR IA (4.0n g/ml)	カン ア (4.0n g/ml)	1CT P (4.5n g/ml)	IL-2レ ア (220- 530U/ ml)
2000/4/5	35	PD	10.9		1.8	1430	19.2	11.6	139								1	6.9	1.2	2.1	579
2000/4/22	35	PD									25>	55	32	3.0>	36		1.4	7.2	1.7	2.7	636
2000/6/17	37	PD	18.4	10	2	1380	25	7.8>	492			46					1.2	11	3	2.4	626
2000/8/12	39	PD										73					1.1	27	5.4	5.4	
2000/9/9	40	PR	17.8	7.7	2.4	1670	38.8	8	673								0.9	16	3.3	3.6	
2000/11/17	42	PR										44					1.2	14	2.5	2.5	
2001/1/5	44	NC								633	37	63	29	3.0>	28	5.5	42			1.8	
2001/1/26	45	PD	20.6	11.8	1.6	3070	44.2	12	309	676		58					1	22	5.8	2.7	
2001/3/23	47	PD								792		55					0.8	28	4.2	3.1	708
2001/4/20	48	NC	20.2	10.9	1.7	1160	17.3	12.8	125	565	48	61	31	5.1	32	5.3	47	1.3	26	4.5	2.4
2001/6/15	49	NC								548		52					1.4	27	5.6	2.3	630
2001/7/14	50	PD	14.7	6.9	2	3310	39.7	14.8	215	523		68					1.4	34	6.4	2.5	680
2001/9/14	52	NC	9.5	6.2	9	4040	62.7	28	311	638							0.8	38	5.2	1.9	682
2001/10/20	54	NC								731	94	53					1.6	32	4.7	2.9	593
2001/12/15	56	NC	13.4	9.7	1.7	3360	66	54.2	305	575		55					1.3	33	6.8	3	558
2002/1/12	56	NC								594	86	66		3.0>			1.5	33	5.3	2.2	542
2002/3/16	59	PD	12.8	14.8	1.6	2340	70.2	49	43	878		84					2	85	13	6.1	648
2002/5/25	61	PD								784		35					1.9	100	11	5.8	693
2002/6/14	62	PD	11	13.2	7.2	2.7	6810	104	97.7	175	600						3.4	95	14	6.5	644
2002/7/12	63	PD								708		35					3.9	110	20	5.8	
2002/8/10	63	PD								582							4	170	26	4.7	
2002/8/31	64	PR	16.2	6.6	2.1	1.6	2540	35.7	47.8	183	562	30					4	140	20	5.2	688
2002/9/14	65	CR	17.0	12.3	7.2	2.7	3420	46.2	154	342		27					1.4	4.0	4.0	2.5	342

2002/8/17
イレッサ
投与開始

症例 3

右肺腺癌で両肺に粟粒性肺転移と多発肋骨転移が認められ、呼吸困難と激しい背部痛が出現していた症例に 2002 年 8 月 3 日よりイレッサ 1 錠 250mg/日を NITC に併用連日投与した。

- 5 8 月 31 日の投与後約 1 ヶ月で右肺原発巣は半減し粟粒性肺転移もほとんど消失し、多発肋骨転移も消失した。TNF α 、IFN γ 、及び IL-12 産生誘導も増加し、腫瘍マーカーの CEA が治療前 256ng/ml から 172ng/ml と、また SLX-1 が 480U/ml から 140U/ml と半減以下となった。(PR 判定) (図-2) (表-3)

(以下余白)

10

15

20

25

(表 3)

症例③ 両肺粟粒性肺転移

TH 62y.o. Female 肺(腺)Ca. 肋骨転移
初診 2001/11/16

受付日	治療 期間 (月)	有効 性	CD3+ CD16 1+(16 %)	CD3- CD16 1+ (11%)	CD8+ PER+ (14%)	TH1/ TH2(C D4)比(7 以上)	TNF α (1000 pg/ml)	IFN γ (10 IU/ml)	IL-12 (7.8pg /ml)	IL-10 (pg/m l)	VEGF (pg/m l)	CEA(5.0ng /ml)	シリアル LEX- 1 (38U/ ml)
2001/11/16	0		9.5	19.2	5.8	5.4	1180	14.5	19.5	305	215	53.3	280
2001/12/8	1	PD									248	60.3	280
2002/1/5	2	PD	6.6	21.4	6.6	5.4	1870	17.7	21.1	139	234	72.9	290
2002/2/2	3	PD									206	88.9	280
2002/3/2	4	PD										133	350
2002/3/23	4	NC									261	141	430
2002/4/13	5	PD	7.5	22.7	3.8	4.2	1440	16.3	7.8>	284	151	175	410
2002/5/11	6	PD									282	210	400
2002/6/8	7	PD									336	245	460
2002/7/6	8	NC	5.7	30	4.4	5.1	2810	19.9	12.8	454	269	256	480
2002/8/31	10	PR	8	27.2	4.1	5.3	1680	16.4	45.4	111	248	172	140

2002/8/3
イレッサ
投与開始

NITC と抗癌剤、放射線との併用は、IFN γ 、IL-12 の産生誘導を阻害するが、NITC とイレッサの併用は IFN γ 、IL-12 の産生を抑制せずかえって増加させる傾向が認められた。Th1 サイトカインの産生は骨転移を改善するために重要であり、破骨細胞分化増殖に対し TRAF6 を阻害することで阻害作用が認められている。またイレッサは TRAF6 の下流の c-fos mRNA のシグナル伝達を阻害することで破骨細胞の分化増殖を阻害することが可能である。(図-3)

イレッサは、c-fos mRNA の発現を抑制して EGFR のチロシンキナーゼシグナル伝達系を抑制すると共に破骨細胞の分化を阻害する。また、新免疫療法 (NITC) により IFN γ や IL-12 等の Th1 サイトカインを増量することで破骨細胞の分化を c-fos より上流で阻害し、イレッサと NITC とは相加あるいは相乗的に骨転移を改善することが可能となる。骨転移に関しては NITC により Th1 サイトカインの産生増強により破骨細胞の分化における TRAF6 の産生を抑制し、さらにイレッサによる TRAF6 の下流にある c-fos mRNA の発現を抑制して 2 重システムで骨転移を阻害する。従って、骨転移に対しても NITC とイレッサは相加あるいは相乗的に作用し症例 1、症例 2 および症例 3 の骨転移を改善したものと考えられる。

イレッサは癌細胞に直接的あるいは間接的に抗腫瘍性を作用するのに対し、NITC は β -1,3 グルカン投与で Th1 サイトカイン (TNF α 、IFN γ 、IL-12) を産生増強し、CTL のみならず NK や NKT 細胞も活性化する。一方、 α -1,3 グルカン投与で NK と NKT 細胞を活性し、effector 細胞を活性化する。また、NITC は ADCC 活性化も促進することが分っている。すなわち、イレッサの分子標的治療と免疫療法とは相互に補いながら癌の治療効果を亢める作用が認められた。

イレッサによる治療では、EGFR チロシンキナーゼ阻害により癌細胞の縮小 (PR) (約 20%) と増殖の停止 (NC) (約 50%) の成績である。NITC を併用することで β -1,3 グルカンで Th1 サイトカイン \rightarrow CTL 活性を促し、 α -1,3 グルカンで NK および NKT 細胞を活性化することによりそれぞれの effector 細胞を増殖、活性化することが可能である。これらの活性化 CTL、NK および NKT 細胞がイレッサで発育、増殖の減速あるいは停止状態におちいった腫瘍細胞を攻撃し

やすくなることによるものと考えられる。従って人類がこれまで治療不能と考えられた粟粒性肺転移や骨転移など難治性悪性腫瘍も治療可能となる。

(実施例 2)

5 症例 4 73 歳 男性

2000 年 8 月 10 日に小腸平滑筋肉腫で小腸切除し、2001 年 12 月 27 日に肝転移で肝動脈塞栓術を施行し経度に縮小をみた。その後、2002 年 7 月肝転移が増大し、腹膜転移も出現した。そのため、2002 年 7 月 22 日より、NITC 治療を開始した。2002 年 8 月 20 日より、グリベック 400mg/日の投与も開始した。8 月 10 20 日時点での、Th1 サイトカインの活性化は起こっており、各 TNF α (2570pg/ml)、IFN γ (17.5IU/ml)、IL-12(49.8pg/ml)であった。NK 活性も強い値 [CD3(-)CD161(+): 30.6%] を示した。しかし、NKT 細胞活性はみとめられなかった [CD3(+)-CD161(+)-perforin(+): 29.9%]。腫瘍マーカーは GAT は 22.9u/ml (正常値 13.6 以下)、BFP : 93ng/ml(正常値 75 以下)、ICTP : 5.2ng/ml 15 (正常値 4.5 以下) と高値を示した。約 1 ヶ月間、NITC とグリベックの併用療法を続け、2002 年 9 月 18 日に測定した各免疫マーカーの値は前回よりも増強していた。各 TNF α (4322pg/ml)、IFN γ (34.8IU/ml)、IL-12(98.3pg/ml)、NK 活性 [CD3(-)CD161(+): 35.4%]、NKT 細胞活性 [CD3(+)-CD161(+)-perforin(+): 32.4%]。腫瘍マーカーは GAT は 18.3u/ml (正常値 13.6 以下)、BFP : 79ng/ml(正 20 常値 75 以下)、ICTP : 4.8ng/ml (正常値 4.5 以下) であった。そして、驚いたことに、同時に行った超音波検査で肝転移は 50%以上縮小し、異常を示した腫瘍マーカーも全て改善していた。

症例 5 62 歳 女性 子宮筋肉腫

25 2000 年 1 月 26 日に子宮筋肉腫で子宮全摘出と両側付属器官の切除を受けた。しかし、腹腔内残存腫瘍が認められた。2000 年 2 月から 5 月まで、パラプラチン、エンドキサン、テラルピシンの抗癌剤投与を受けたが PD と判定された。2001

年 11 月 15 日に左腹部腹壁に手拳大の腫瘍が出現し、2002 年 1 月 23 日再切除を施行した。その後、2002 年 2 月から 4 月までイホマイドの抗癌剤投与したが 2002 年 4 月に右腹壁に 6 x 5 c m 大の子宮筋肉腫の再々転移が認められた。2002 年 8 月 10 日に超音波検査で右腹壁に 103 x 88 x 81mm と左腹壁に 29 x 30 x 27mm の肉腫の増大が認められた。

2002 年 8 月 10 日より、グリベック 400mg / 日と NITC の併用療法を行った。2002 年 9 月 17 日の超音波検査で右腹壁の腫瘍 58 x 40 x 39mm と左腹壁の腫瘍 15 x 14 x 13mm と半減していた。また、Th1 サイトカインの産生能力の増強が確認された (TNF α (4106pg/ml)、IFN γ (33.5IU/ml)、IL-12(80.6pg/ml)。

- 10 症例 4、症例 5 はいずれも末期肉腫である。これらの症例では、NITC 単独では PD であったが、グリベック併用で約 1 ヶ月の極めて短い期間でいづれも著大な改善 (PR) を得た。これまでのグリベックの投与報告例では 4 ヶ月から 6 ヶ月の投与で 20 % 前後の奏効例しか報告されていない。しかし、本臨床例では、極めて短期間に処方例全てで PR を達成した。このことは、NITC 療法特に IL-12
- 15 の産生誘発療法とグリベックの併用療法は、上記イレッサの NITC 療法特に IL-12 の産生誘発療法との併用療法と同様に、対癌治療に対して相乗効果が発揮されたものと推定された。かくして、本発明により、チロシンキナーゼ阻害剤と Th1 サイトカイン産生増強剤の併用には、対抗癌効果に相乗効果のあることを確認した。
- 20 なお、抗癌剤と NITC の併用療法では Th1 サイトカイン値の著大な抑制が認められたが、本発明のチロシンキナーゼ阻害剤と NITC の併用療法ではいずれも免疫能力を上昇させ、そして抗腫瘍作用においても相乗的に作用することが確認された。

(実施例 3)

- 25 NITC とイレッサとの併用治療における、癌の免疫治療の実施例 1、2 の症例 1~5 症例を含む 55 症例での治療結果を総括した。55 症例の癌の進行度は、初期段階から進行末期段階であり、癌種類は肺癌、大腸癌、肛門癌、腎癌、舌癌、

乳癌、胃癌、前立腺癌、食道癌、膵癌、咽頭癌、耳下腺癌、膀胱癌、子宮頸癌、
卵巣癌である。また、各症例の NITC とイレッサとの併用治療期間は、約 2 ～ 4
ヶ月間である。また、各症例での、患者には、実施例 1 と同様に、IL-12 産生誘
導剤、さめ軟骨（セイシン企業）、及び α 1,3 構造をもつ糖類（NK、NKT 活性化
5 剤）が、各推奨処方により投与された。また、イレッサは、各推奨処方に従い、
例えば、症例 1 のように、250mg/日の量を経口投与した。

各癌種での奏効率の検討

肺（腺）癌は 15 例中 PR 症例が 12 例の 80%に奏効例が認められた。残り 3 例
10 は NC 症例であった。肺（腺）癌症例では 4 例が粟粒性肺転移症例である。すな
わち肺（腺）癌のなかでも粟粒性肺転移は最も予後が不良で呼吸困難を合併し、
従来の治療法では全くといってよいほどに改善することは不可能であった。この
ような粟粒性肺転移症例はイレッサ単独では改善することはあり得ないと考えら
れる。また肺（腺）癌のイレッサ単独治療例はこれまで奏効例の割合は 20%前後
15 と報告されているが、今回の NITC とイレッサとの併用は 15 例中 12 例である
80%が PR 例という驚くべき改善率を示した（図 4）。

大腸癌は直腸癌と結腸癌とに分類される。一般に直腸癌は結腸癌に比較し、予
後不良と考えられている。NITC とイレッサとの併用治療による効果は、直腸癌
は 4 例でいずれも PR と判定され奏効率 100%であった。一方、結腸癌は 7 例で
20 PR が 5 例（71.4%）、NC が 1 例（14.3%）、そして PD が 1 例（14.3%）であっ
た。従って大腸癌としては PR が 9 例（81.8%）という驚くべき改善率を示した
（図 5）。

NITC とイレッサとの併用治療による効果において、肺（腺）、大腸癌以外の癌
種で、PR 症例が認められた悪性腫瘍は、肛門癌 2 例中 1 例の 50%、腎癌 2 例中
25 2 例の 100%、舌癌は 1 例中 1 例の 100%、卵巣癌が 4 例中 2 例の 50%であり、
胃癌が 3 例中 1 例の 33.3%、乳癌は 6 例中 1 例の 16.7%であった。また、前立腺
癌は 2 例中 2 例が NC であり、腫瘍マーカーの PSA は低下しなかったが骨転移

の疼痛は著明に改善した。食道癌は 3 例中 2 例の 66.7%が NC、膀胱癌、喉頭癌、耳下腺癌の各 1 例は NC で進行が停止していた。膀胱癌と子宮頸癌ではいずれも PD 症例のみであった。

NITC とイレッサとの併用治療による効果において、肺（腺）癌、大腸癌（結腸癌、直腸癌）、腎癌、舌癌、卵巣癌、胃癌、肛門癌、乳癌の有効例では Th1 サイトカインの $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{IFN}\gamma$ および IL-12 が高値を示す傾向が認められた。また、VEGF も抑制している傾向が認められた。一方、NK 細胞と NKT 細胞においては有効例と無効例とで差は認められなかった。従ってイレッサ（商品名）と免疫療法の併用治療は Th1 サイトカインのなかでも $\text{IFN}\gamma$ と IL-12 とを上昇させ得ることがこのような著効例を見出しているものと考えられる（図 6）。

現在、イレッサ（商品名）と抗癌剤との併用ではその効果が認められていないが、本発明に係る NITC（特に IL-12 産生誘導剤）とイレッサとの併用治療では、各癌種での治療効果を確認できた。特に、肺（腺）癌、大腸癌（結腸癌、直腸癌）、腎癌、舌癌、卵巣癌、胃癌、肛門癌、乳癌種に対しての NITC（特に IL-12 産生誘導剤）とイレッサ（商品名）との併用治療は有効である。

以上より、ガン患者に本発明に係る NITC（特に IL-12 産生誘導剤）とイレッサ R との併用治療を施すことは、有効なガンの治療方法となる。

（実施例 4）

免疫療法(NITC)の単独症例の 46 例(CR:1 例、PR:13 例、LNC:2 例、SNC:22 例、PD:8 例)および免疫療法(NITC)とイレッサ(250mg/日/経口)追加併用例の 27 例(CR:2 例、PR:20 例、NC:5 例、PD:0 例)の合計 73 例において、イレッサ投与の寄与度と各免疫学的因子のそれぞれにおける寄与度(率)を検討した。結果は、ロジスティック回帰係数によって図 7 に示した。

肺腺癌の治療において全体で検討すると、第一はイレッサを投与するか否かが最も重要である。第二が、IL-12 の産生能力と NKT 細胞でのパーフォリン産生細胞(NKTP と記載)がほぼ同率で重要である。ついで $\text{IFN}\gamma$ 、 $\text{TNF}\alpha$ の産生能力

の順で意義があった。

免疫療法(NITC)とイレッサ投与症例の26例における、免疫学的各ファクターの寄与率を検討した。結果は、ロジスティック回帰係数によって図8に示した。その結果、イレッサ投与前ではNKTP細胞(NKT細胞でPerforin⁺陽性細胞)が最も重要な意義を示した。イレッサ投与前における患者の免疫能力の差違で本療法での有効群と無効群での識別が可能か否かを判定することは肺腺癌患者の治療方針決定にとって重要なことと考えられた。

そこで、まずイレッサ投与前のNKTP細胞の割合(総リンパ球中のNKTP細胞の割合)を確認し、結果を図9に示した。NKTP細胞数(割合)を5.0%でカットオフ値とした場合、92.9%が有効と判定された。しかし、NKTPが5.0%以下でもなお57.1%は有効例であり、判定から落ちこぼれている。この5.0%未満となった症例については、さらにTh1/Th2比で有効例を判定できることが判明した。すなわち、図8から明らかであるように、イレッサ投与前後の変化量としてTh1/Th2比が非常に高値を示しているので、この指標を用いてNKTPが5.0%未満の症例を解析した。図10に示されたように、Th1/Th2比がイレッサ投与後に増加した場合に88.9%の割合で有効例を判定できることがわかった。Th1/Th2比がイレッサ投与後に減少すると100%無効例となった。

以上の結果をまとめると、NKTP値が5.0%以上であればイレッサとNITC併用で有効性が高く、NKTP値が5.0%未満の値でも、Th1/Th2比がイレッサ投与後に増加していれば有効性が期待できる可能性が高いことが示唆された。かくして本実施例の分析結果から、NITCとイレッサ併用投与症例において、NKTP値のイレッサ投与前値が5.0%以上、もしくはイレッサ投与後のTh1/Th2比が増加していれば、NITCとイレッサ併用投与による有効例が有意に高いと判定される($p<0.001$) (図11)ことが判明した。

(実施例5)

実施例4の臨床例によって、免疫療法(NITC)とイレッサとの併用療法のさらな

る有用性を分析した。分析結果は図 1 2 に示した如く、イレッサ投与 1 ヶ月以降に、腫瘍の増殖が抑制される B タイプとイレッサ投与の効果がない A タイプに分かれることが判明した。さらに、症状が良くなった B タイプでも、さらに 6 ヶ月以内に、再燃・再発する C タイプと再燃しない D タイプに分かれることが判明した。それぞれの分岐点でどちらのタイプ (A 又は B タイプ、C 又は D タイプ) にいくかを予測することが出来れば有効なガン免疫治療の指標となる。また、イレッサ投与後、数週間から 5 ヶ月、好ましくは 1 ヶ月から 3 ヶ月に患者の免疫学的各ファクターを測定することによって、その後の免疫療法(NITC)とイレッサの併用療法を継続することが有効な治療となるかを予測することが出来れば有効なガン免疫治療の指標となる。そのために、タイプの予測因子を明らかにするために宿主の免疫学的特徴 (腫瘍マーカー) を検討した。

その結果、A タイプ又は B タイプになるかは、イレッサ投与前の NKTP 値が 5.0%以上であれば B タイプとなり、たとえ NKTP 値が 5.0%未満でもイレッサ投与後の Th1/Th2 比が増加していれば B タイプの方向に向かうことが判明した (図 8 ~ 1 1)。また、NKTP 値が 5.0%未満で、Th1/Th2 比が減少していれば A タイプとなり、イレッサは効果を発揮しないことが判明した。

一方、C タイプ又は D タイプになるかは、図 1 3 に示した結果により Th2 値の割合が 3 %を超えれば D タイプに向かい、3 %未満の場合には再燃・再発する C タイプになることが判明した。ただし、D タイプに向かう場合にはイレッサ投与後の IL-12、INF γ の値がイレッサ投与後でも低下していないことが重要であると判明した (図 1 4)。

以上の分析結果をもとに、イレッサと NITC との抗腫瘍作用の相違を図 1 5 のシェーマに示した。

癌細胞の増殖が著明な場合は抗原も提示されていない。癌細胞は増殖が激しい細胞ほど EGFR が多いはずである。この EGFR のシグナル伝達系のチロシンキナーゼ阻害作用でイレッサが細胞内でシグナルをブロックする。このことによって癌細胞の核がアポトーシスにおちいり、核の障害が起こり癌細胞の表面に FAS

抗原や癌抗原の ClassI または ClassII 抗原が表出する。その結果 CTL 細胞（キラーT 細胞）や NK 細胞が抗原認識し免疫細胞が癌細胞をターゲットとして攻撃しアポトーシス小体となった癌細胞を食食することになる。

5 従って図 1 5 に示した如くイレッサと NITC の併用療法では、まずイレッサが癌細胞での増殖を促す EGFR のシグナル伝達をブロックする。その後、免疫細胞が活性化して癌を攻撃するという時間差があると考えられる。

イレッサが作用するか否かは NKT パーフォリン活性と Th1 サイトカインが重要である。また、腫瘍が一時縮小し、その効果が続くか否かは IFN γ と IL-12 の産生が投与後も持続することが重要である。またその際に Th2 系の免疫系が必要
10 となるものと推定される。

産業上の利用可能性

15 以上の実施例によれば、チロシンキナーゼ阻害剤と IL-12 産生誘導剤（Th1 サイトカイン産生増強）の併用はガンの治療において相乗効果あることが見出され、ガン治療における画期的な成果を達成した。

請求の範囲

1. チロシンキナーゼ阻害剤と IL-12 産生誘導剤が併用されることを特徴とするガンの治療剤。
- 5 2. チロシンキナーゼ阻害剤が、以下の 1) ~ 7) の少なくとも 1 の受容体に対する選択的標的作用を有する請求項 1 のガンの治療剤。
- 1) HER2/neu、2) HER3、3) HER4、4) c-kit、5) PDGFR、6) bcr-abl、7) EGFR
3. チロシンキナーゼ阻害剤が、選択的に EGFR 又は c-kit 標的作用を有する請求項 1 のガンの治療剤。
- 10 4. IL-12 産生誘導剤が、 β 1,3/1,6 グルカン構造を有する物質である請求項 1 ~ 3 の何れかに記載のガンの治療剤。
5. IL-12 産生誘導剤が、 β 1,3/1,6 グルカン構造を有する茸菌系体由来成分又は酵母由来成分である請求項 4 のガンの治療剤。
- 15 6. ガンの化学療法剤及び放射線治療との併用無しに処置される請求項 1 ~ 5 の何れかに記載のガンの治療剤。
7. NKT 細胞の NKR-P1 に選択的に作用して NKT 細胞の活性化をおこす物質と併用される請求項 1 ~ 6 の何れかに記載のガンの治療剤。
8. 血管新生阻害能を有する物質と併用される請求項 1 ~ 7 の何れかに記載のガンの治療剤。
- 20 9. 以下の 1) 又は 2) のいずれか 1 をマーカーとしてチロシンキナーゼ阻害剤と IL-12 産生誘導剤の併用治療が行われる請求項 1 ~ 8 の何れかに記載のガンの治療剤。
- 1) NKTP 値の投与前値が 5.0%以上の測定値を示す、
- 25 2) Th2 値の投与前値が 3 %以上の測定値を示す
10. Th1/Th2 比がイレッサ投与前値に比較して、投与数ヶ月後に増加の測定値を示すことを併用治療の継続のマーカーにする請求項 1 ~ 9 の何れかに記載の

ガンの治療剤。

1 1. NKTP 値の投与前値が、5.0%未満の測定値を示すことを特徴とする請求項 1 0 に記載のガンの治療剤。

1 2. IL-12、INF γ の測定値が、イレッサ投与前値に比較して投与数ヶ月後の値
5 で低下していないことを併用治療の継続のマーカーにする請求項 9 に記載のガンの治療剤。

1 3. ガンの治療剤が肺（腺）ガン治療剤であることを特徴とする請求項 1 ～1 2 の何れか一に記載のガンの治療剤。

1 4. 請求項 1 ～1 3 の何れか一に記載のガン治療剤を用いたガンの治療方法。

図 1

肺(腺)Ca. 脳、頸椎、胸椎meta

N.S. 39y.o. M

2002.7.23よりイレッサ投与開始



2002.7.2

2002.8.6

2002.8.27

図 2

肺(腺)Ca. 骨meta

T.H. 61y.o. F

2002.8.3よりイレッサ投与開始



2002.6.8

2002.8.31

図 3

破骨細胞分化の必須シグナル

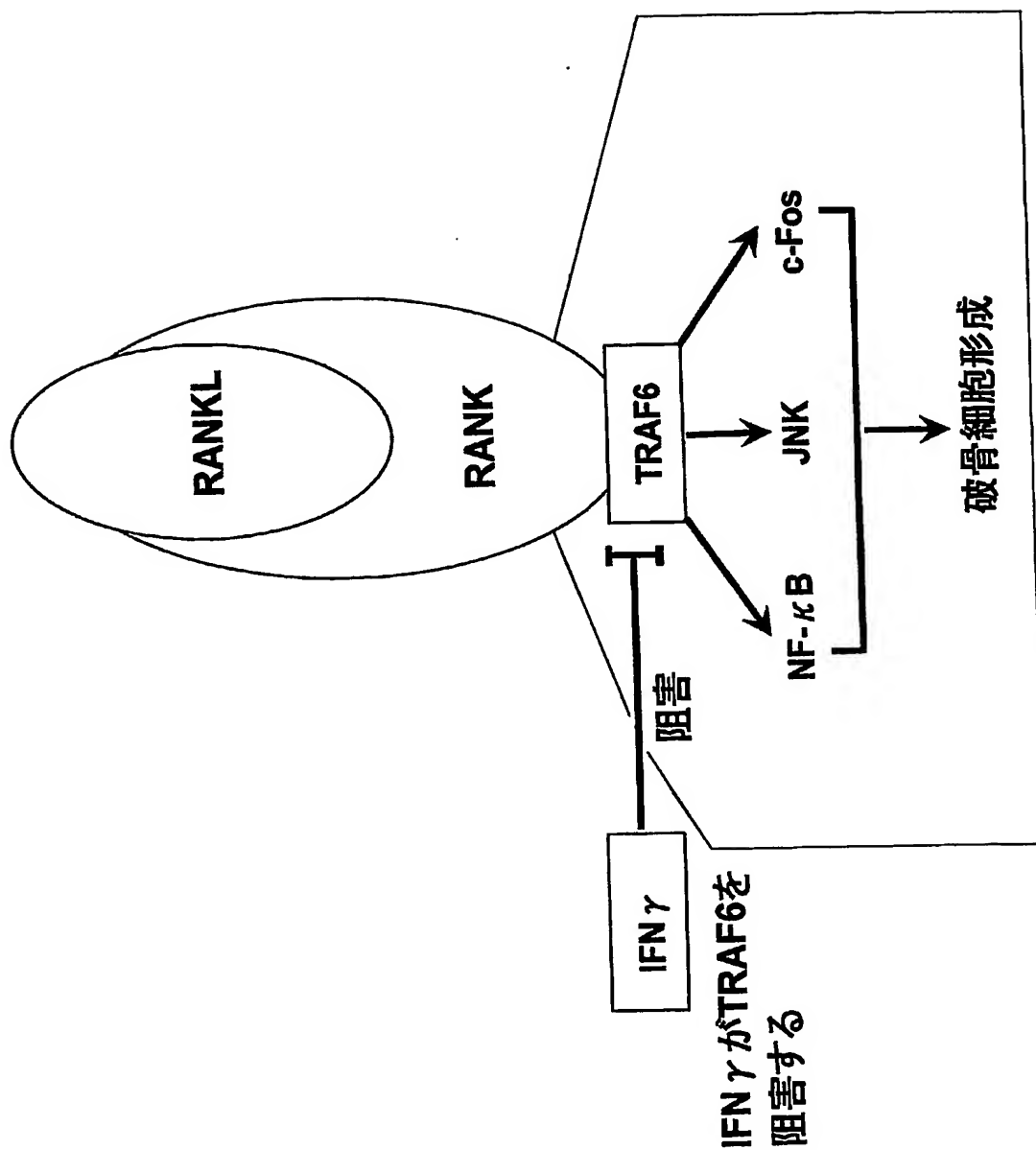


図 4

肺腺癌の奏効例(イレッサとNITCの併用療法)

		年齢	性別	転移巣	評価
1	T.H.	61	F	肋骨	PR
2	N.S.	39	M	脳、頸椎、胸椎	PR
3	H.T.	78	M		PR~CR
4	F.T.	66	F		PR
5	M.F.	51	F		PR
6	C.I.	59	M	両肺、骨(多発)	PR
7	S.Y.	69	M		PR
8	K.F.	71	F	骨(多発)	PR
9	K.M.	74	F		PR
10	T.S.	66	F		PR
11	O.K.	69	F		PR
12	U.S.	79	F	肺内	PR
13	I.Y.	71	M	骨(多発)	NC~PR
14	I.Y.	73	M		NC~PR
15	O.K.	57	F		NC

肺腺癌の奏効率 : PR 12/15(80.0%)
 : NC 3/15(20.0%)

図 5

大腸癌の奏効例（イレッサとNITCの併用療法）

結腸癌

	年齢	性別	部位	転移巣	評価
1	K.Y. 57	F	C		PR
2	S.I. 63	F	S	頸部リンパ節	PR
3	M.K. 53	M	A	頸部リンパ節、肺	PR
4	H.M. 51	M	D	肝	PR
5	H.S. 64	F	S	肝、骨	PR
6	S.N. 67	F	T	肺	NC
7	O.T. 63	M	S+C	肺、肝	PD

直腸癌

	年齢	性別	転移巣	評価
1	Y.Y. 57	M	肝	PR
2	O.T. 64	M	(直腸+A)	PR
3	K.H. 60	M		PR
4	K.M. 64	F	肺、肝	PR

結腸癌の奏効率 : PR 5/7(71.4%)
: NC 1/7(14.3%)
: PD 1/7(14.3%)

直腸癌の奏効率 : PR 4/4(100%)

大腸癌の奏効率 : PR 9/11(81.8%)
: NC 1/11(9.1%)
: PD 1/11(9.1%)

図 6

イレッサとNITC併用治療方法の奏効例

	PR	NC	PD	合計n数
肺(腺)癌	12(80.0%)	3(20.0%)	0(0%)	15
大腸癌	9(81.8%)	1(9.1%)	1(9.1%)	11
結腸癌	5(71.4%)	1(14.3%)	1(14.3%)	7
直腸癌	4(100%)			4
肛門癌	1(50%)		1(50%)	2
腎癌	2(100%)			2
舌癌	1(100%)			1
乳癌	1(16.7%)	1(16.7%)	4(66.7%)	6
胃癌	1(33.3%)		2(66.7%)	3
前立腺癌		2(100%)		2
食道癌		2(66.7%)	1(33.3%)	3
膀胱癌		1(100%)		1
喉頭癌		1(100%)		1
耳下腺癌		1(100%)		1
膀胱癌			2(100%)	2
子宮頸癌			1(100%)	1
卵巣	2(50.0%)	1(25.0%)	1(25.0%)	4
合計	29(52.7%)	13(23.6%)	13(23.6%)	55

図 7

各マーカーの奏効に対する寄与度 (肺腺癌)

n=73(イレッサ投与者27,非投与者46)

p=0.700

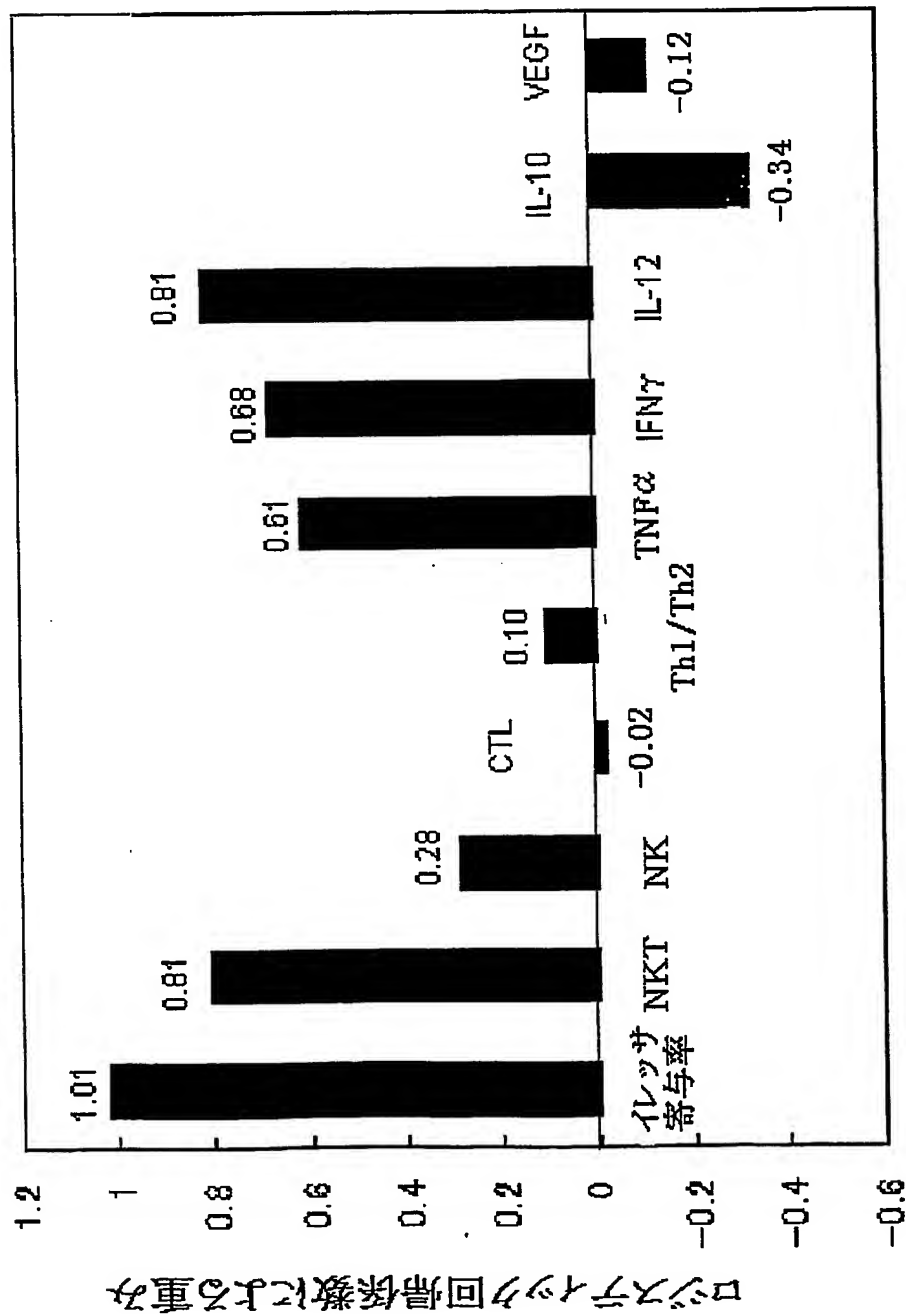


図 8

イレッサ投与(肺腺癌)における奏効への寄与

n=26, p<0.001

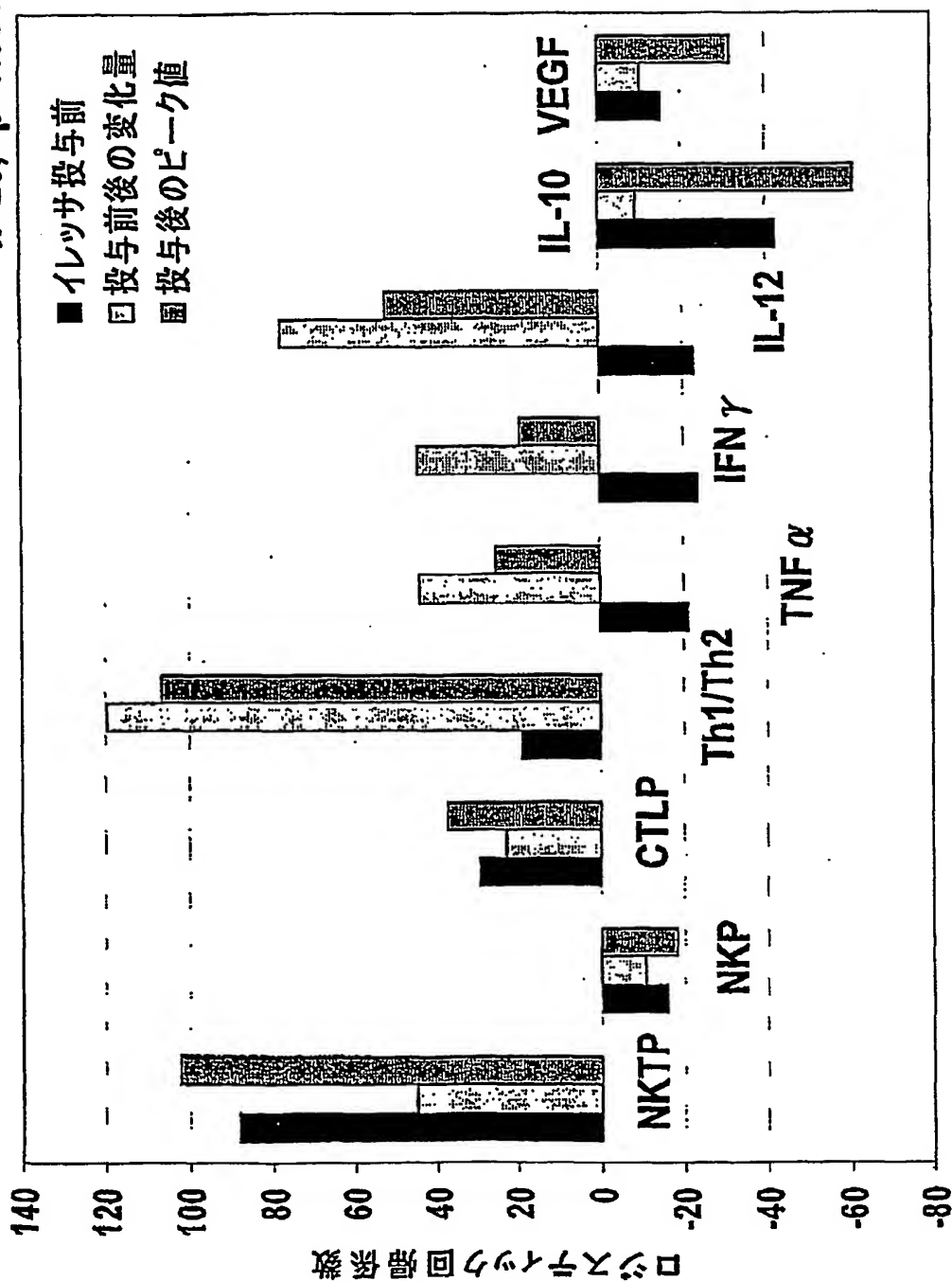
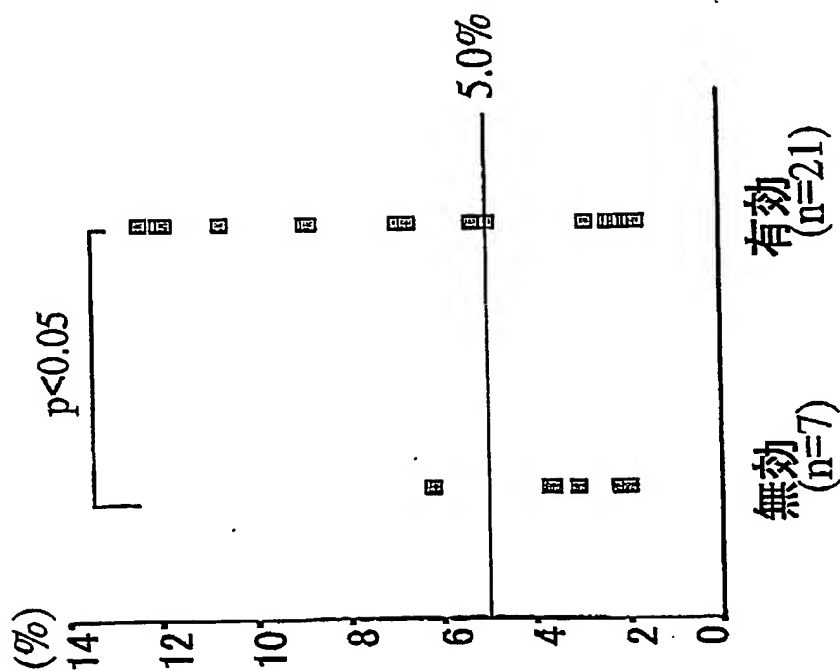


図 9

イレッサ投与前における有効例(B群)と無効例(A群)の比較

イレッサ投与前のNKTP パーフォリン活性(%)	有効例	無効例	合 計
5.0以上	13	1	14
5.0未満	8	6	14
合計	21	7	28

(p<0.05)



NKTP ≥ 5.0

NKTP < 5.0

無効例: 7.1%

5.0%

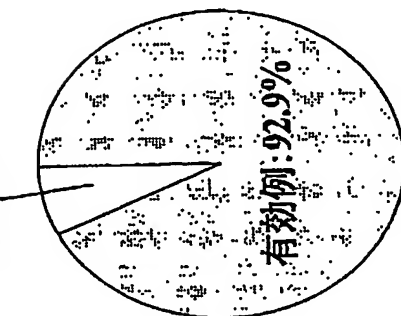
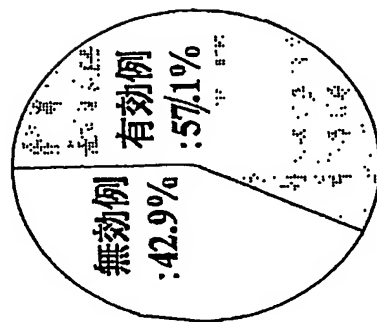
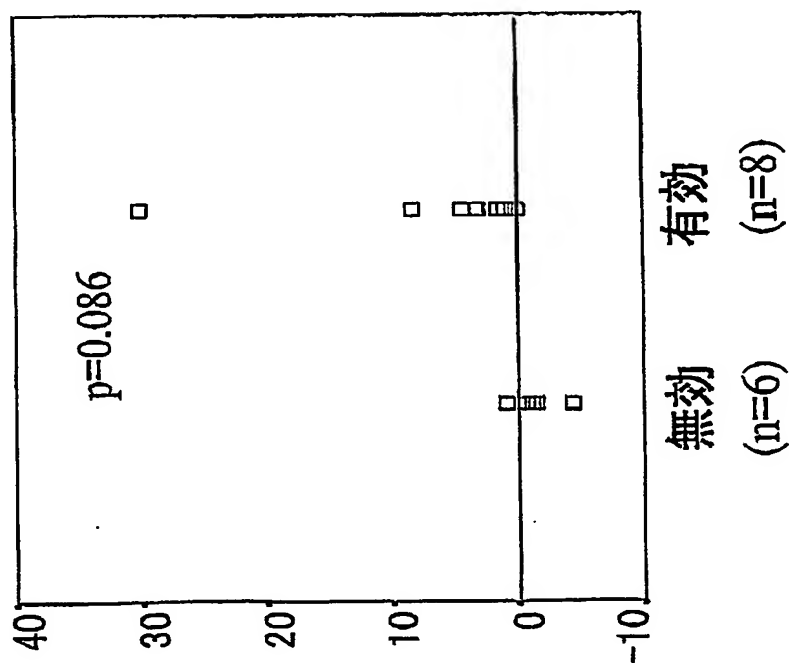


図 1 0

NKTP<5.0における有効例(B群)と無効例(A群)の比較

イレッサ投与前後のTh1/Th2比の変化	有効例	無効例	合 計
増加	8	1	9
減少	0	5	5
合計	8	6	14

($p<0.01$)



イレッサ投与後
Th1/Th2が増加

イレッサ投与後
Th1/Th2が減少

無効例: 11.1%

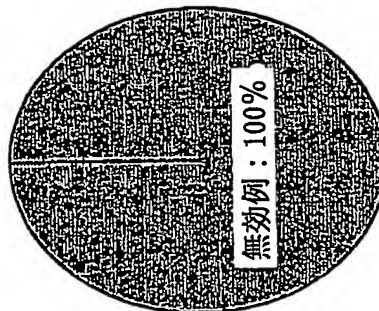
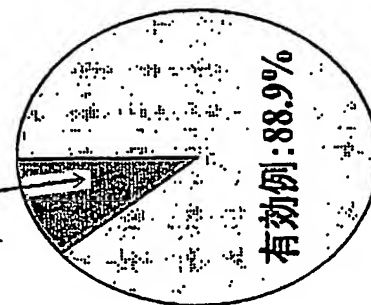


図 1 1

2つの閾値による有効・無効群

	有効	無効
NKTP \geq 5.0または Th1/Th2が増加	21	2
NKTP<5.0かつ Th1/Th2が減少	0	5
計	21	7

カイ2乗検定による検定
p<0.001

図 1 2

イレッサと新免疫療法との作用時期の相違

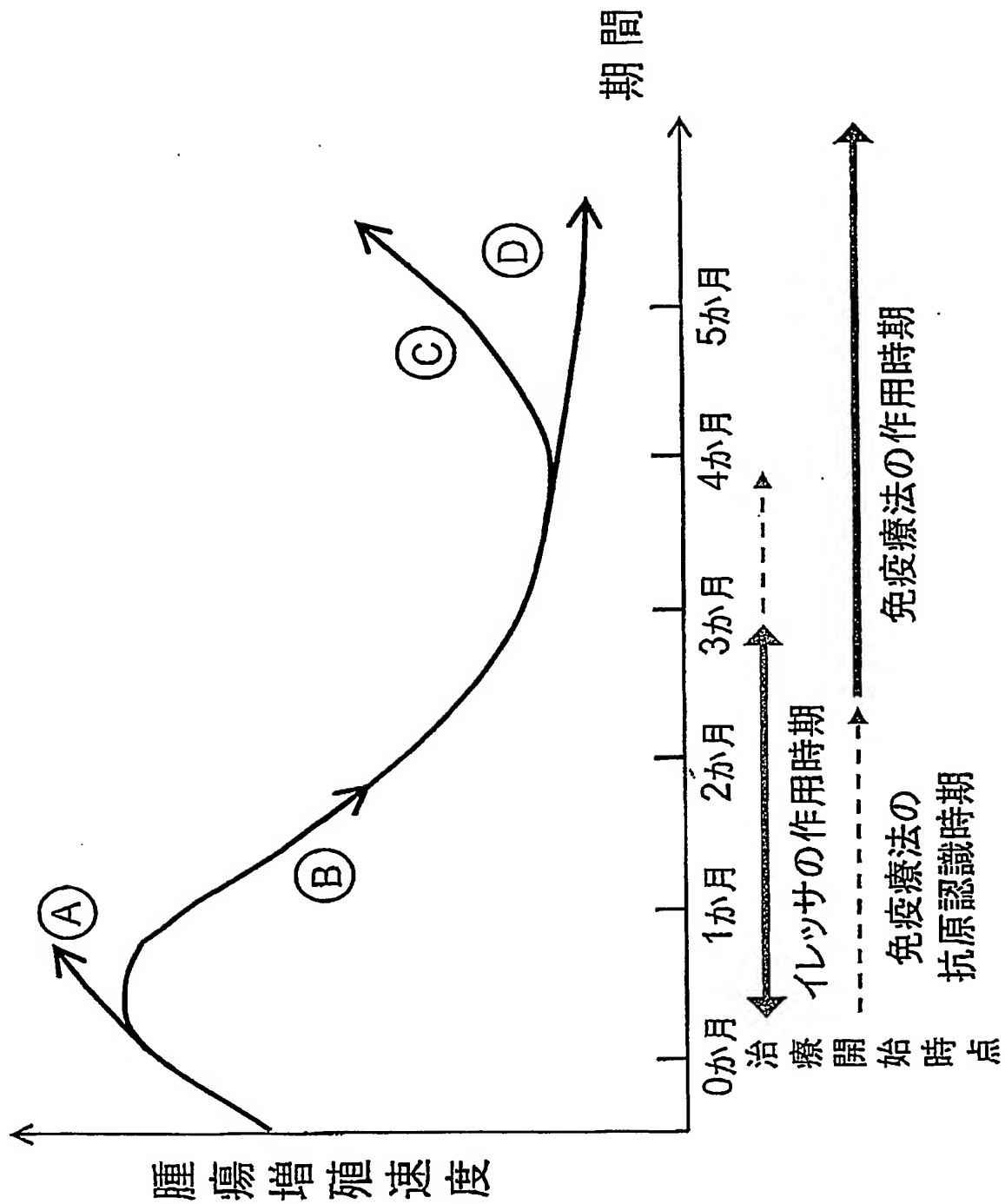
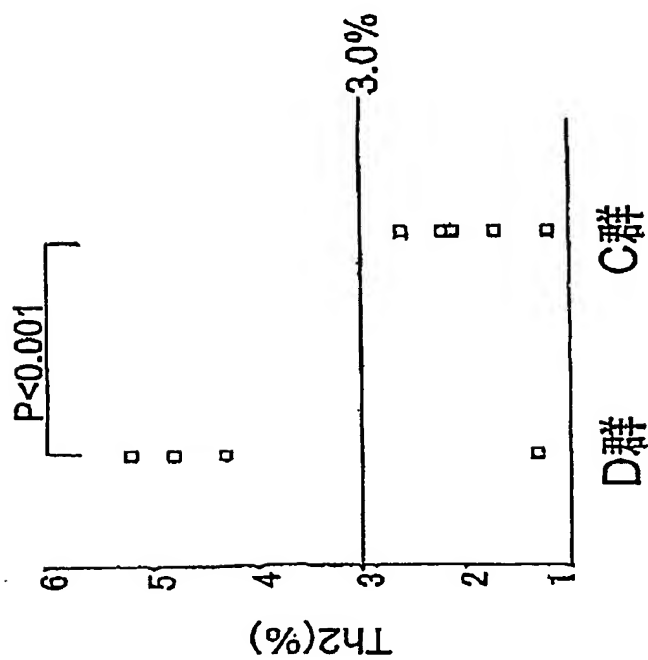


図 1 3

イレッサ投与前におけるC群とD群の比較

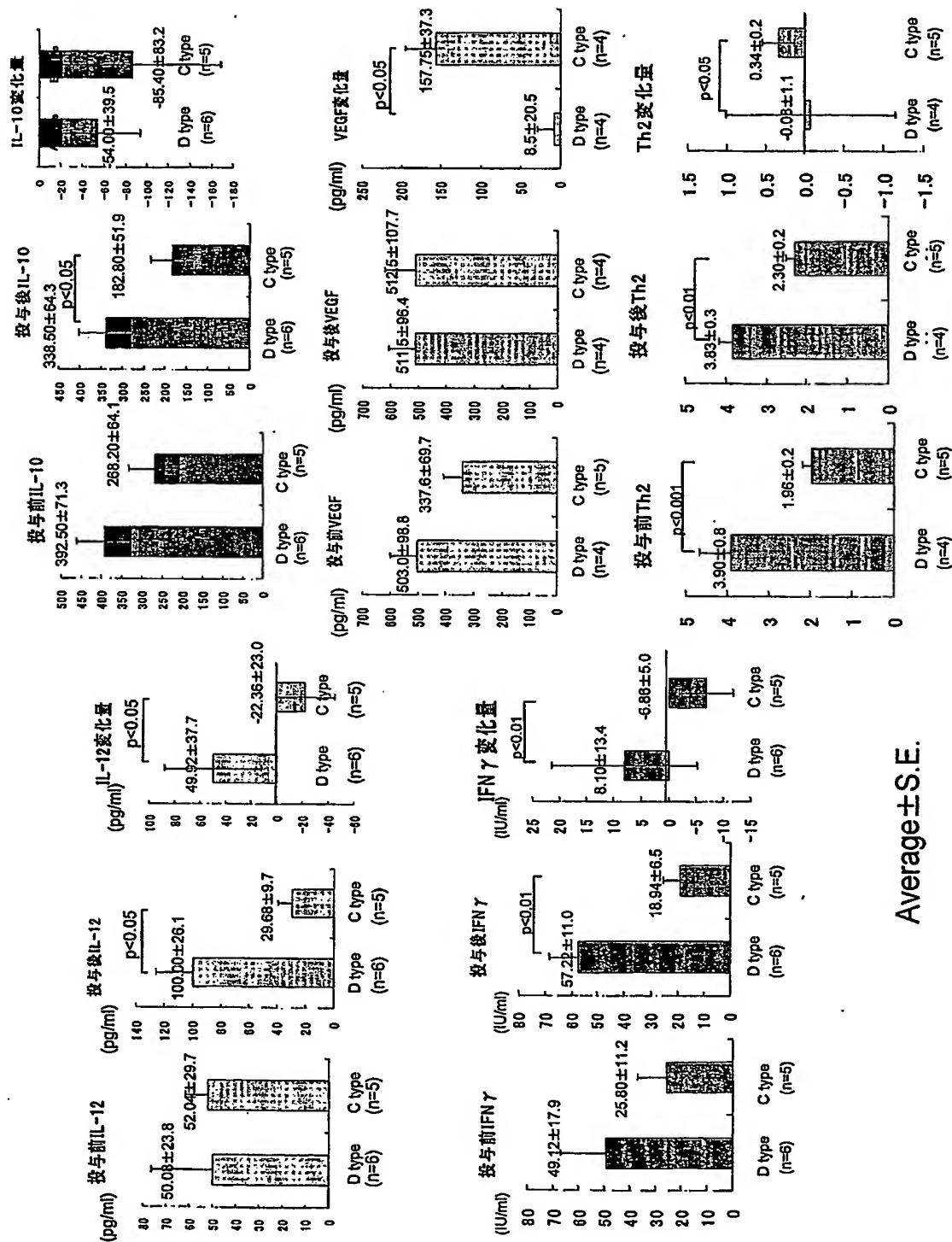


イレッサ投与前のTH2 (%)	C 群	D 群	合 計
3.0以上	0	5	5
3.0未満	5	1	6
合計	5	6	11

(p<0.05)

図 14

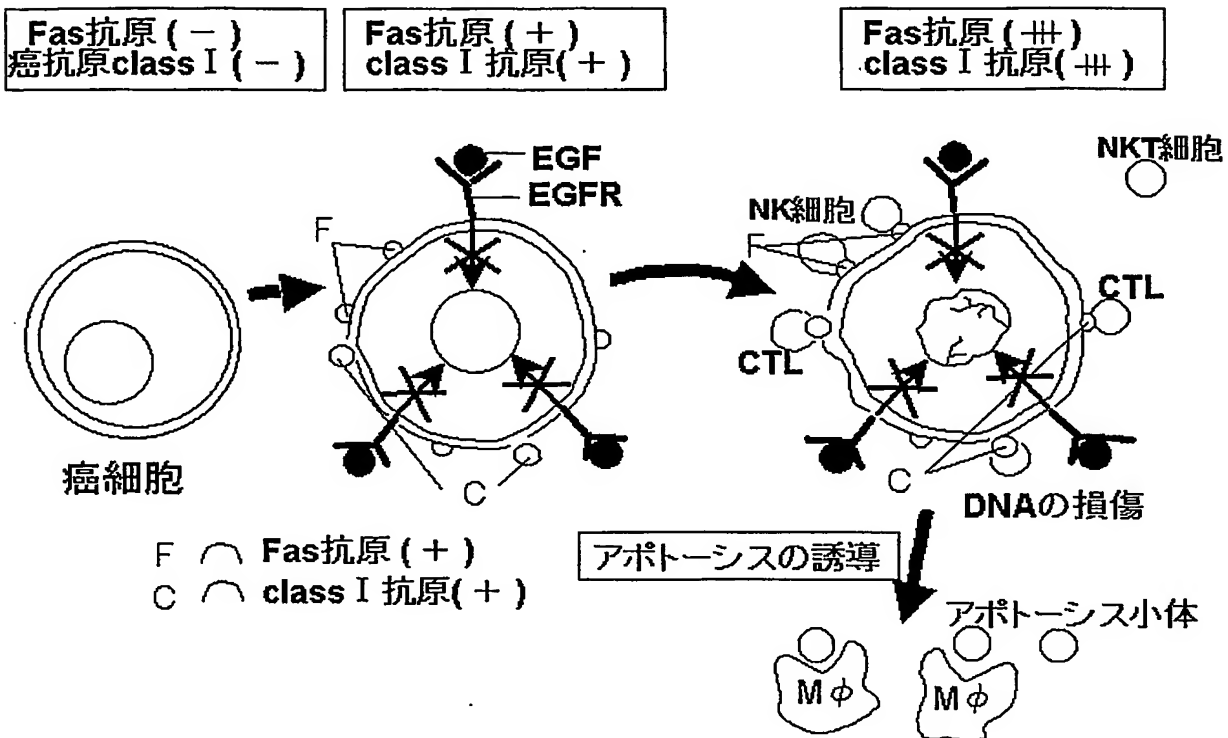
C群、D群におけるサイトカインの相違



Average ± S.E.

図 1 5

イレッサとNITCとの相乗作用機序(仮説)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11895

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K45/00, 45/06, A61P35/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K45/00, 45/06, A61P35/00, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 844002 A1 (Asakuni YAGITA), 27 May, 1998 (27.05.98), Particularly, Claims; examples & JP 10-139670 A & US 6238660 B1	1-13
Y	JP 2001-081047 A (Asakuni YAGITA), 27 March, 2001 (27.03.01), Particularly, Claims; examples (Family: none)	1-13
Y	WO 01/54724 A1 (Orient Cancer Therapy Co., Ltd.), 02 August, 2001 (02.08.01), Particularly, Claims; examples & EP 1250934 A1	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
19 December, 2003 (19.12.03)

Date of mailing of the international search report
20 January, 2004 (20.01.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11895

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Akikuni YAGITA et al., 'Shinsei Kekkan Sogaizai to Naiinsei IL-12 too Mochiita Shin Men'eki Ryoho -Tokuni NKT Saibo no Kan'yo ni Tsuite', Biotherapy, 2000 May, Vol.14, No.5, pages 433 to 439	1-13
Y	sho kaii et al., 'Kokei Gan ni Taisuru Bunshi Hyoteki Chiryo 1 Kobunshi Busshitsu 1. Tyrosine Kinase Sogaizai (1)ZD1839', Blood Immunity Cancer, 20 July, 2002 (20.07.02), Vol.7, No.3, pages 13 to 22	1-13
Y	Tetsuji TAKAYAMA et al., 'Kokei Gan ni Taisuru Bunshi Hyoteki Chiryo 1 Kobunshi Busshitsu 1. Tyrosine Kinase Sogaizai (2)STI-571 (imatinib Mesylate) o Mochiita GIST no Chiryo', Blood Immunity Cancer, 20 July, 2002 (20.07.02), Vol.7, No.3, pages 23 to 27	1-13
Y	WO 01/82935 A1 (Orient Cancer Therapy Co., Ltd.), 08 November, 2001 (08.11.01), Particularly, Claims; examples & JP 2002-3403 A & US 2002/10149 A1 & EP 1277472 A1	7
Y	Hisashi ARASE 'NKT Saibo no Cytokine Sansei to Sono Igi', Saishin Igaku, 2000 April, Vol.55, No.4, pages 818 to 823	7
Y	JP 10-147534 A (Asakuni YAGITA, Seishin Enterprise Co., Ltd., NOF Corp.), 02 June, 1998 (02.06.98), Particularly, Claims; examples & CN 1185319 A	8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11895

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 14

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 14 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11895

<Subject of Search>

Claim 1 relates to a therapeutic for cancer which contains, as the active ingredient, a combination of compounds defined by desired properties, i.e., "a tyrosine kinase inhibitor" and "an IL-12 production inducer". Although claims 1 to 13 involve combinations of any compounds having these properties, it appears that only parts of the claimed compounds are supported by the description in the meaning within PCT Article 6 and disclosed therein in the meaning within PCT Article 5.

Although the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, the scopes of the compounds being "a tyrosine kinase inhibitor" and "an IL-12 production inducer" cannot be specified. Thus, claims 1 to 13 do not comply with the requirement of clearness in accordance with PCT Article 6 too.

Therefore, the search was made on the relationship among "a tyrosine kinase inhibitor" and "an IL-12 production inducer" and a cancer therapeutic, and cancer therapeutics containing, as the active ingredients, iressa or gleevec which are specifically cited as "a tyrosine kinase inhibitor" in the description and β -1,3 glucan or α -1,3 glucan which are specifically cited as "an IL-12 production inducer" therein.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A61K45/00, 45/06, A61P35/00, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A61K45/00, 45/06, A61P35/00, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	EP 844002 A1 (八木田旭邦), 1998.05.27, 特に特許請求の範囲及び実施例 & JP 10-139670 A & US 6238660 B1	1-13
Y	JP 2001-081047 A (八木田旭邦), 2001.03.27, 特に特許請求の範囲及び実施例 (ファミリーなし)	1-13
Y	WO 01/54724 A1 (株式会社オリエントキャンサーセラピー), 2001.08.02, 特に特許請求の範囲及び実施例 & EP 1250934 A1	1-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19.12.03

国際調査報告の発送日

20.1.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 のぶ



4C

9454

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	八木田旭邦等, 「新生血管阻害剤と内因性 IL-12 とを用いた新 免疫療法 -特にNK T細胞の関与について-」, Biotherapy, 2000年5月, 第14巻, 第5号, p. 433-439	1-13
Y	蒋海菊等, 「固形がんに対する分子標的治療 1. 小分子物質 1. チロシンキナーゼ阻害剤 ①ZD1839」, 血液・免疫・ 腫瘍, 2002年7月20日, Vol. 7, No. 3, p. 13- 22	1-13
Y	高山哲治等, 「固形がんに対する分子標的治療 1 小分子物質 1. チロシンキナーゼ阻害剤 ②STI-571 (Imatinib Mesylate) を用いたGISTの治療」, 血液・免疫・腫瘍, 20 02年7月20日, Vol. 7, No. 3, p. 23-27	1-13
Y	WO 01/82935 A1 (株式会社オリエントキャンサーセ ラピー), 2001. 11. 08, 特に特許請求の範囲及び実施例 & JP 2002-3403 A & US 2002/10 149 A1 & EP 1277472 A1	7
Y	荒瀬尚, 「NK T細胞のサイトカイン産生とその意義」, 最新医 学, 2000年4月, 第55巻, 第4号, p. 818-823	7
Y	JP 10-147534 A (八木田旭邦, 株式会社セイシン企 業, 日本油脂株式会社), 1998. 06. 02, 特に特許請求の 範囲及び実施例 & CN 1185319 A	8

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 14 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲14は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

<調査の対象について>

請求の範囲1は、「チロシンキナーゼ阻害剤」並びに「IL-12産生誘導剤」という所望の性質により定義された化合物の組合せを有効成分とするガンの治療剤に関するものである。そして、請求の範囲1-13は、そのような性質を有するあらゆる化合物の組合せを包含するものであるが、PCT6条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分にすぎないものと認められる。

また、「チロシンキナーゼ阻害剤」並びに「IL-12産生誘導剤」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求の範囲1-13は、PCT6条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は、「チロシンキナーゼ阻害剤」並びに「IL-12産生誘導剤」とガンの治療剤との関係について、及び、「チロシンキナーゼ阻害剤」として明細書に具体的に記載されているイレッサまたはグリベック、並びに「IL-12産生誘導剤」として明細書に具体的に記載されている β -1, 3グルカン又は α -1, 3グルカンを有効成分とするガンの治療剤について行った。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.